

氏名 村 上 雅

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 授 与 番 号 博乙第 1992 号

学 位 授 与 の 日 付 平成元年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 要 件 博士の学位論文提出者（学位規則第 5 条第 2 項該当）

学 位 論 文 題 目 遺伝子導入細胞における遺伝子発現の *in situ* ハイブリダイゼーションによる検出

論 文 審 査 委 員 教授 矢部芳郎 教授 新居志郎 教授 佐藤二郎

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

遺伝子導入を行った細胞における遺伝子発現を分子細胞化学的に検出するために、ビオチンおよび $[^{32}\text{P}]$ で標識したプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。本研究で用いたビオチン標識プローブとその検出系はフィルターハイブリダイゼーションで 1 pg の DNA を検出する感度を有することを示した。まず組換えプラスミド pSV2neo の導入によりネオマイシン耐性に形質転換した細胞株を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションの諸条件の最適化を行ったところ、蛋白質分解酵素による細胞の前処理が最も重要であることがわかった。この方法を用いてネオマイシン耐性 mRNA が形質転換細胞の細胞質に局在していることが証明された。次にクローン化したヒトリンバ芽球様株化細胞産生レトロウイルスのプロウイルスゲノムを同ウイルスの許容細胞であるイヌ胸腺由来細胞株 (Cf2Th) にトランスフェクションし、遺伝子の一過性の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションと酵素抗体法で検出した。トランスフェクション後 48 時間目に数 % の細胞においてウイルス由来の RNA と抗原が発現していることが両細胞化学的方法によって証明された。従ってビオチンおよび $[^{32}\text{P}]$  標識プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションは細胞に導入された遺伝子の発現を個々の細胞において検出する極めて有用な方法であることが示された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究者は、組換えプラスミド pSV2neo 及び pSMH を導入した細胞に、ビオチン標識プラスミド DNA をプローブとして、*in situ* ハイブリダイゼーションを行うと、プラスミドに特有な mRNA を検出出来ることを確認し、この方法が、細胞における遺伝子発現を確認するのに適したものであることを証明した。以上により、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。